

## Cyclodextrin patent (translated)

(54) Protein Stabilizing Agent

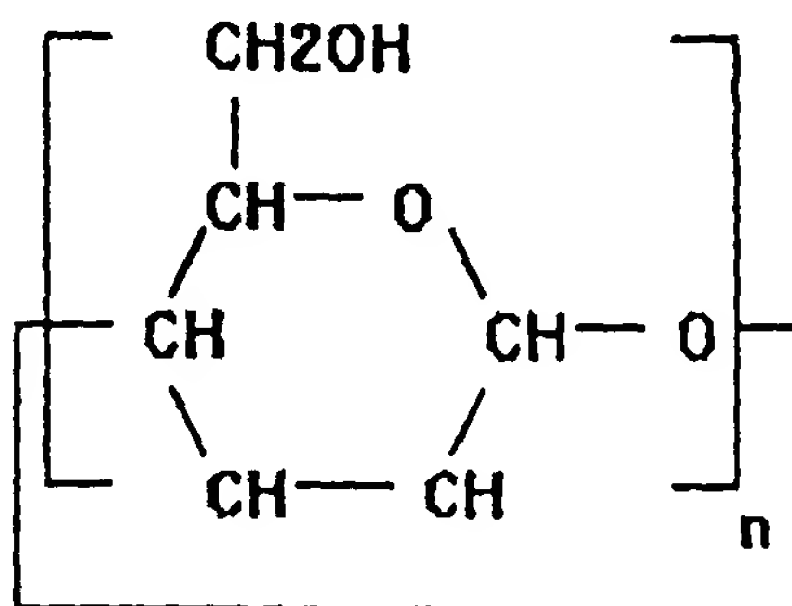
(11) 59-104556 (A) (43) 16.6.1984 (19) Japanese patent

(21) Appl. no. 57-215236 (22) 7.12.1982

(71) Sekisui kagaku kogyo K.K. (72) Kazutoshi Yamazaki (2)

### TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

#### 1. General formula



(in formula, n is 6-8 integer)

Protein stabilizer of cyclized oligosaccharide is shown in the above formula.

### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Aldoses such as glucose have been used to prevent denaturation of protein in blood and enzyme. These aldoses usually have active hydroxide groups which denatures the protein by a nonenzymatic reaction with the amino acids of the protein at normal temperatures (5-30°C). For example, the amino acids of the  $\beta$  chain of hemoglobin (Hb) A might react with glucose. When blood is stored at 4 °C, Hb becomes saccharified and the level of HbA<sub>1</sub> a+b is raised. Since the reduced sugar reacts with the terminal amino group or lysine residue easily, human Hb changes to HbA<sub>1c</sub> by the saccharified reaction between HbA and glucose in vitro or in vivo. An enzyme is also saccharified by a similar reaction, and its activity is decreased. The purpose of this invention is to prevent the denaturation of protein in blood and enzyme.

The main purpose is to stabilize proteins by cyclized oligosaccharides which have the formula shown above.

Proteins in blood and enzymes are composed of amino acids and maintain a three dimensional formation through the secondary binding of amino acids. But protein is easily denatured by cutting its secondary binding. Measuring Hb and saccharified Hb in blood are regular medical test items, but Hb is denatured easily. For example, Hb denatures during storage, and when saccharified Hb is measured by high performance chromatography, denatured Hb is eluted at the same position as saccharified Hb. As a result, saccharified Hb will be over estimated. Therefore, to accurately measure saccharified Hb, it is necessary to stabilize Hb in the sample before storage. The aldose which has been used as a stabilizer, glycosylates the terminal amino group of Hb and makes saccharified Hb, so that the detection of this saccharified Hb is obviated as a positive error. Hence, aldoses are not appropriate as stabilizers for protein. Various studies have been done with respect to saccharides in order to prevent the denaturation of protein in blood and enzyme, and as a result, it is found that the cyclized oligosaccharide having the constitutional formula shown in the figure, that is cyclodextrin, consisting of 1.4 bond of dextrose, provides an excellent effect as a protein stabilizer for blood and enzyme. Three types of cyclodextrin ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) are prepared from starch by a reaction with amirase.  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\gamma$ -cyclodextrin can be used individually or together. The optimum concentration of cyclodextrin used as stabilizer for blood and enzyme is from 0.001 mole to 0.01 mole. The denaturation of the protein can be prevented for a long period of time, and in the case of, for example, blood, the detection of the hemoglobin saccharified by the denatured protein as a positive error is obviated in a clinical measurement of a saccharified hemoglobin value. The decrease in the activity of enzyme is obviated in the stage of a measurement relating to enzyme.

#### EXAMPLE 1

One ml of octylphenoxypolyoxyethanol as a hemolysis reagent and 0.5 ml of  $\beta$ -cyclodextrin as the protein stabilizer were added to 1,000 ml of distilled water. Ten  $\mu$ l of normal plasma treated with anticoagulant reagent was mixed with 1.5 ml of the above solution and stored at 24°C. Samples were taken out of the mixture after 0, 5, 10 and 15 hours, and the value of HbA<sub>1a+b</sub> was measured by high performance liquid chromatography. The result is shown in figure 1. The result without  $\beta$ -cyclodextrin is also shown as open circles for comparison. The denaturation of protein was less with  $\beta$ -cyclodextrin than without  $\beta$ -cyclodextrin. After 15 hours, the value of HbA<sub>1a+b</sub> in the sample with  $\beta$ -cyclodextrin was 60% of that without  $\beta$ -cyclodextrin.

## EXAMPLE 2

Two grams of  $\alpha$ -cyclodextrin were used instead of 0.5g of  $\beta$ -cyclodextrin under the same conditions as in example 1. The value of HbA<sub>1</sub> a+b measured by high performance liquid chromatography was 3.6%. The result was 87% of the value without  $\alpha$ -cyclodextrin.

## EXAMPLE 3

0.2g of  $\gamma$ -cyclodextrin was used instead of 0.5g of  $\beta$ -cyclodextrin under the same conditions as in example 1. The value of HbA<sub>1</sub> a+b measured by high performance liquid chromatography was 3.9%. The result was 86% of the value without  $\gamma$ -cyclodextrin.

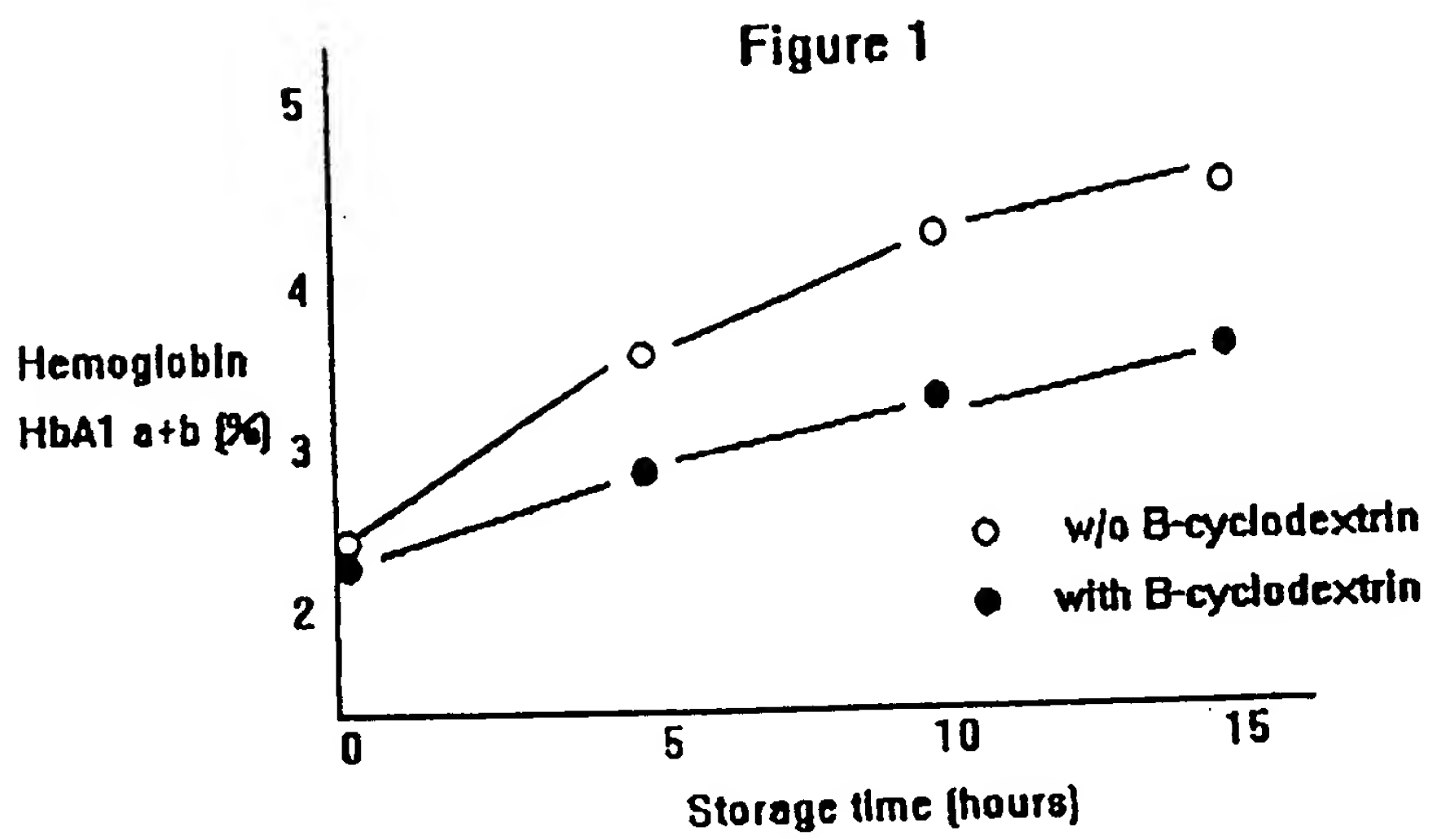
## EXAMPLE 4

An ammonium sulfate suspension containing 5 mg/ml of  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) was centrifuged at 2,000g for 15min.. The precipitate was collected and reconstituted with 1 ml of 0.01M-phosphate buffer (pH7.0) containing 1mM-magnesium chloride and 0.1M-sodium chloride. The solution, called  $\beta$ -Gal solution, was diluted 121 times with phosphate buffer and mixed with  $\beta$ -cyclodextrin solution in phosphate buffer at the ratio of 1 to 1 and incubated at 37°C for 20 hours. The activity in  $\beta$ -Gal was measured by the following method. 50 $\mu$ l of mixture was mixed with 500 $\mu$ l of 0.02M-phosphate buffer, pH7.2 containing 0.1%-ortho-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside, 1mM-sodium magnesium, 0.1M-sodium chloride, 0.1%-bovine serum albumin, and 0.1%-sodium azide at 30°C for 30 minute. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1M-sodium carbonate and the absorption of ortho-nitrophenyl derived from ortho-nitrophenyl  $\beta$ -D-galactopyranoside was measured at a 420 nm wavelength. The ratio of absorbance of the sample with and of the sample without stabilizer was used as the indicator for stability of the enzyme. The ratio at a concentration of 0.001M- $\beta$ -cyclodextrin was 1.44 and 1.54 at 0.01M- $\beta$ -cyclodextrin.

## EXPLANATION OF FIGURE

The relationship between the value of HbA<sub>1</sub> a+b and storage time with and without  $\beta$ -cyclodextrin is shown in figure 1.

Patent Applicant  
Sekisui Kagaku Kogyo K.K.  
Representative: Mototoshi Fujinuma



12 公開特許公報 (A)

昭59-104556

51 Int. Cl.<sup>3</sup>  
G 01 N 33/66  
A 61 K 35/14  
37/14  
37/54  
C 12 N 9/96  
G 01 N 33/68

識別記号

庁内整理番号  
8305-2G  
7138-4C  
7138-4C  
7138-4C  
7421-4B  
8305-2G

43 公開 昭和59年(1984)6月16日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 4 頁)

蛋白質安定化剤

大阪府三島郡島本町百山2番2号

①特 願 昭57-215236

②発 明 者 松尾文雄

③出 願 昭57(1982)12月7日

奈良市法蓮町986番地

④発 明 者 山崎和俊

①出 願 人 積水化学工業株式会社

大津市南郷二丁目46番3号

大阪市北区西天満2丁目4番4号

⑤発 明 者 石川文雄

号

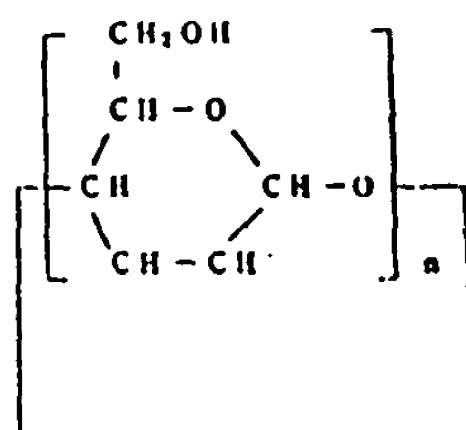
明 細 書

発明の名称

蛋白質安定化剤

特許請求の範囲

1. 一般式



(但し上式においてnは6乃至8の整数)

で表わされる環化オリゴ糖からなる蛋白質安定化剤

発明の詳細な説明

本発明は血液、酵素等の蛋白質安定化剤に関する。

従来から血液、酵素等の蛋白質の変性を防ぐ

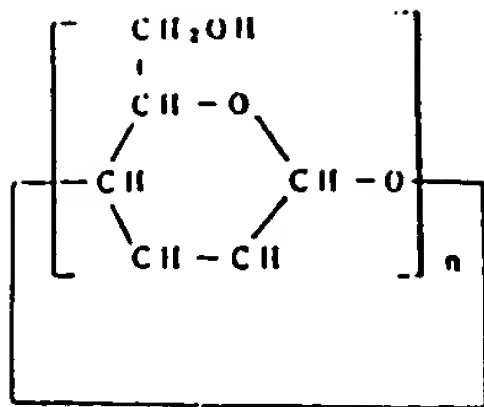
的でグルコース等のアルドース類が添加されてきた。

しかしながらグルコース等のアルドース類は通常活性水酸基を有しており、その活性水酸基と蛋白質中のアミノ酸が反応(5~30℃)で非酵素的に反応し蛋白質の変性を生ずる。例えばヘモグロビン(Hb)Aのβ鎖のアミノ末端とグルコースが糖化反応したり、血液が4℃で保存された場合においてもHbが糖化しHbA<sub>1c</sub>の増加をきたす。

このように固元糖では蛋白質中のアミノ末端及びリジン残基と容易に反応するので、例えば人HbではHbAとグルコースが体内、体外を問わず反応して糖化しHbA<sub>1c</sub>を生ずる。即ちでも同様に糖化を生じ酵素活性の低下をきたすことになる。

本発明はこのような欠点を解消し、血液、酵素等における蛋白質の変性を防ぐことを目的とするものであり、その要旨とするところは、

一般式



(但し上式においてnは6乃至8の整数)  
 であらされる環化オリゴ糖からなる蛋白質安定  
 化剤に含有する。

次に本発明蛋白質安定化剤について更に詳細に  
 説明する。

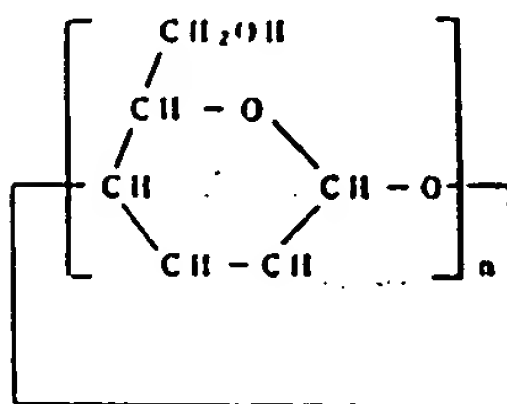
血液、酵素等の蛋白質はアミノ酸を構成成分と  
 し、その二次結合によって立体的形状が保たれ  
 ている。しかしその二次結合は切断を受け、蛋  
 白質の特性を失なうことになりやすい。

ところで血液中のHbは、血中Hb濃度測定及び  
 血中酸化Hb濃度測定等の臨床検査の対象とな  
 るが、このHbも変性を生ずる。例えば酸化Hb  
 の測定では測定機体の保存中にHbの変性を生

じ、変性Hbは高速液体クロマトグラフィーに  
 よる分離測定では酸化Hbの位置に検出される  
 ため、見掛け上変性Hbが増加すると酸化Hb濃  
 度に対し正の誤差を生ずる。このため元々検体  
 に含まれていた正確な酸化Hb濃度を測定する  
 には検体の保存及び使用中にHbの変性を防ぐ  
 ことが必要となる。しかしこれまで使用されてき  
 たアルドース類ではHbのアミノ末端とグリコ  
 シル化し酸化ヘモグロビンとなるので、元々検  
 体中に含まれていた酸化Hb濃度に対して正の  
 誤差を生ずる。このためアルドース類は蛋白質  
 安定化剤としての適用性を欠いている。

そこで血液、酵素の蛋白質の変性を防ぐために  
 本発明者等が熟知について種々検討を行った結  
 果次の構造式を有する環化オリゴ糖が血液、酵  
 素の蛋白質安定化剤として与えた効果が得ら  
 れることを見出した。

すなわち



上式においてnの値は6、7又は8である。

上記の環化オリゴ糖はデキストロースの1,4結  
 合からなるシクロデキストリンである。

上記の環化オリゴ糖を得るには、デンプン類に  
 アミラーゼを作用させて分解させ、その分解物  
 に四塩化エチレン-四塩化エタン混合溶媒を加  
 えてシクロデキストリン混合物を沈殿させる。  
 次いでその沈殿物を水に溶解させてp-クノン  
 を加えると、β-シクロデキストリン(n=7)、  
 γ-シクロデキストリン(n=8)のみが沈殿  
 し、溶液中にはα-シクロデキストリン(n=6)  
 と一部のβ-シクロデキストリン及びγ-  
 シクロデキストリンが残る。さらにα-シクロ  
 デキストリンをシクロヘキサンにより、β-シ

クロデキストリンをフルオロベンゼンにより、  
 γ-シクロデキストリンをアントラセンによ  
 り夫々分別沈殿することにより3種のシクロデ  
 キストリンをデンプン分解物から単離すること  
 ができる。

α-シクロデキストリン、β-シクロデキスト  
 リン、γ-シクロデキストリンは夫々単独で使用  
 されてもよいし、これらが併用されてもよい。  
 これらは血液、酵素に対する安定化剤として使  
 用されるが、その場合の使用量は0.001セル  
 乃至0.01セルの範囲に付するものとされるの  
 が好適である。

本発明によれば上記構造式の環化オリゴ糖が血  
 液、酵素等に加えられることにより、蛋白質の  
 変性を長期間防ぐことができ、例えば血液の場  
 合には酸化Hb値の臨床測定において蛋白質の  
 変性による酸化Hbが正の誤差として検出され  
 ることがないものとなり、又酵素においても活  
 性の低下をきたすことがないものとなる。

実施例1

凍縮水100μl中に、溶血剤としてオクナルフエノキシポリエトキシエタノール1μl、及び蛋白質安定化剤としてβ-シクロデキストリンQ59を溶解した溶液15μlに健康人抗凝固化血液10μlを混合し、かるく振盪後24℃で保存し、0、5、10、15時間後のHbA<sub>1a+b</sub>値を高速度液体クロマトグラフィー装置にかけて分離測定した。その結果を第1図の実験グラフで示す。尚これとの比較のためにβ-シクロデキストリンのみを除いた溶液を用いて同一条件でHbA<sub>1a+b</sub>値を測定した結果を第1図の点線グラフで示す。これらの結果から明らかなように、β-シクロデキストリンを使用した場合は、使用しない場合に比較して蛋白質の経時変化が少なく、15時間後の値ではβ-シクロデキストリン使用の場合は、使用しない場合に比較して6割程度に低減された。

#### 実施例2

実施例1においてβ-シクロデキストリンにかえてα-シクロデキストリン29を使用した以

外は実施例1と同様にして血液中のHbA<sub>1a+b</sub>値を高速度液体クロマトグラフィーにより分離測定した結果36%であり、α-シクロデキストリンを使用しない場合の87%であった。

#### 実施例3

実施例1においてβ-デキストリンにかえてγ-デキストリンQ29を使用した以外は実施例1と同様にして血液中のHbA<sub>1a+b</sub>値を高速度液体クロマトグラフィーにより分離測定した結果39%であり、γ-デキストリンを使用しない場合の86%であった。

#### 実施例4

5mg/mlのβガラクトシダーゼ(以下β-Galと略す)の純安懸濁液を20009で15分間遠心分離しその上清を1mM塩化マグネシウム、0.1M塩化ナトリウムを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH値7.0)1μlに溶解させてβ-Gal溶液を調製した。さらにそのβ-Gal溶液をリン酸緩衝液により121倍希釈したものと、β-シクロデキストリンのリン酸緩衝液溶液を各相

比で1:1に混合後、1μlずつ比色管にとり、37℃で20時間インキュベートした。その後、β-Galの酵素活性を測定し、経時の低下を比較した。酵素活性の測定は、50μlの酵素溶液を500μlの0.1M塩基のオルソ-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシド、1mM塩化マグネシウム、0.1M塩化ナトリウム、0.1M塩基の牛血清アルブミン、0.1M塩基のソジ化ナトリウムを含む0.02Mリン酸緩衝液(pH値7.2)と混合し、30℃で30分反応後、2μlの0.1M炭酸ナトリウムを加えて酵素反応を停止させ、オルソ-ニトロフェニルβ-D-ガラクトピラノシドの分解によって生じたオルソ-ニトロフェノールの吸収を420nmの波長の可視分光光度計にてその吸光度によって求めた。この場合添加剤の入っていないブランクとの吸光度比を求め酵素安定化効果とした。

この場合β-シクロデキストリンの濃度は0.001モルでは安定化率(試料の吸光度/ブランクの吸光度)は1.44であり濃度0.01モルでは安

定化率は1.54であった。

#### 図面の簡単な説明

第1図は実施例1においてβ-シクロデキストリンを使用した場合及び使用しない場合のHbA<sub>1a+b</sub>値と検体保存時間との関係を示すグラフである。

特許出願人

積水化学工業株式会社

代表者 藤 沼 基 利



2.151

